

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 1999 05 14

申 请 号： 99 1 07284.7

申 请 类 别： 发明专利

发明创造名称： 具有免疫细胞趋化和造血刺激活性的趋化因子

申 请 人： 北京医科大学；北京北医联合生物工程公司

发明人或设计人： 马大龙；韩文玲；张颖妹；宋泉声；狄春辉；黄家强；汤建；陈光慧



中华人民共和国
国家知识产权局局长

姜颖

2001 年 1 月 22 日

权 利 要 求 书

1. 编码如 SEQ ID NO: 2 中所示多肽之氨基酸 1 至 99 的分离的多核苷酸, 或其片段或等位基因变异体, 或与之杂交的核苷酸片段。
2. 根据权利要求 1 的分离的多核苷酸, 其中所说的多核苷酸编码具有由保藏登记号为 CGMCC No.0392 的生物学样品所包含的 DNA 表达之氨基酸序列的成熟多肽。
3. 编码如 SEQ ID NO: 4 中所示多肽之氨基酸 1 至 152 的分离的多核苷酸, 或其片段或等位基因变异体, 或与之杂交的核苷酸片段; 编码如 SEQ ID NO: 6 中所示多肽之氨基酸 1 至 67 的分离的多核苷酸, 或其片段或等位基因变异体, 或与之杂交的核苷酸片段; 编码如 SEQ ID NO: 8 中所示多肽之氨基酸 1 至 120 的分离的多核苷酸, 或其片段或等位基因变异体, 或与之杂交的核苷酸片段。
4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 的多核苷酸, 其中所说的多核苷酸是 cDNA。
5. 根据权利要求 1 或 2 或 3 的多核苷酸, 其中所说的多核苷酸是 RNA。
6. 根据权利要求 1 或 2 或 3 的多核苷酸, 其中所说的多核苷酸是基因组 DNA。
7. 含有权利要求 1 或 2 或 3 所述之 DNA 的载体。
8. 用权利要求 7 的载体转化、转染或转导的宿主细胞。
9. 具有如 SEQ ID No:2 中所示的氨基酸序列的或由保藏物 CGMCC No.0392 所含的 cDNA 编码的多肽, 及其具有功能等同的片段、类似物或衍生物。
10. 可与权利要求 9 的多肽发生特异性反应的抗体或抑制所说多肽的作用的拮

抗剂。

11. 生产权利要求 8 的多肽的方法, 包括在适于表达所说的多肽的条件下培养含有编码如权利要求 9 限定的多肽之核酸序列的宿主细胞, 然后从培养基和/或细胞裂解物中回收所说的多肽。
12. 含有作为活性成分的权利要求 9 的多肽及一种或多种医药上可接受的载体和/或赋形剂药物组合物。
13. 根据权利要求 9 的多肽或根据权利要求 1 的多核苷酸在生产用于体外和/或体内诊断或治疗由于先天或后天引起的造血功能障碍相关疾病的药物中的应用。
14. 根据权利要求 9 的应用, 其中所说的药物包括用于体外和/或体内诊断或治疗肌肉萎缩、肌肉病变、脱发等疾病的制剂。
15. 根据权利要求 9 的应用, 其中所说的药物包括抗肿瘤剂、抗病毒剂和胚胎发育及组织内环境稳定控制剂。
16. 根据权利要求 9 的多肽或根据权利要求 1 的多核苷酸及由之编码的多肽在生产用于增强 DNA 疫苗或 DNA 药物效力的佐剂中的应用。
17. 根据权利要求 10 的抗体或拮抗剂在生产用于体内和/或体外诊断或治疗心脏梗塞、肝坏死、类风湿性关节炎及自身免疫病的药物中的应用。
18. 诊断与权利要求的多肽表达不是相关的疾病的方法, 该方法包括体外检测编码所说多肽的核酸序列中的突变。
19. 一种体外诊断方法, 该方法包括分析权利要求 9 的多肽在得自宿主体内的样品中的存在。

具有免疫细胞趋化和造血刺激活性的趋化因子

本发明涉及新的具有免疫细胞趋化和造血刺激活性的多肽及其突变体、编码所说的多肽的多核苷酸序列、生产所说的多肽的方法以及所说的多肽及其核苷酸编码序列在诊断或治疗免疫系统疾病、造血系统疾病及肿瘤中的应用。

细胞因子是指由机体细胞合成并分泌的小分子多肽类因子,它们调节机体的生理功能和免疫功能,并在参与多种细胞的增殖和分化的过程中,发挥极为重要的生理或病理功能。细胞因子包括白细胞介素、集落刺激因子、干扰素、肿瘤坏死因子、生长因子、趋化因子等。近年来,随着分子生物学技术的不断进展,对细胞因子的结构、功能、受体、信号传导、表达调控等有了深入的了解。利用基因工程技术生产的重组细胞因子或细胞因子拮抗剂药物已在临床得到应用,收到良好的疗效,开辟了细胞因子新的广阔应用前景。

在细胞因子中,有一类具有细胞趋化作用的小分子多肽,能吸引免疫细胞到免疫应答局部,并参与免疫调节和免疫病理反应。大多数的这类因子是约含100个氨基酸的多肽类分子,现将其命名为趋化因子(chemokine)。根据其结构可主要分为4个趋化因子亚家族:CXC、CC、CX₃C和C亚家族,其中的C代表半胱氨酸,X代表任一种氨基酸。CXC趋化因子的基因多数定位于第4对染色体,其成员包括白细胞介素-8(IL-8)、干扰素诱导蛋白-10(IFN-IP-10)、MGSA等,它们在生物体内主要起活化和趋化中性粒细胞和T淋巴细胞作用。CC趋化因子多数基因定位于第17对染色体上,其成员包括巨噬细胞炎性蛋白-1 α 、 β (MIP-1 α 、 β)、巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、RANTES等,它们则主要活化和趋化单核细胞、淋巴细胞、嗜硷性粒细胞和嗜酸性粒细胞等。CX₃C亚家族目前只发现一个成员,即Fractalkine,其主要功能是活化和趋化T细胞和单核细胞。C亚家族目前也只发现一个成员,即Lymphotactin(Ltn),主要趋化淋巴细胞。趋化因子的受体均属于G蛋白受体家族,其结构特征是具有7个

穿膜区。根据其结合的趋化因子的亚家族成员不同,分别被命名为 CXCR1,2,3,4; CCR1,2,3,4,5,6,7; CX₃CR 等 (参见 Marco B et al, Human Chemokines: An Update Annu. Rev. Immunol. 1997. 15:675-705)。大量的功能研究表明,趋化因子在机体的免疫防御、免疫调节、炎症反应、造血调节、血管生成等方面发挥重要的作用。近年还发现人类免疫缺陷病毒(HIV)可利用趋化因子的受体做为其侵入机体免疫细胞的受体,证明了趋化因子与 HIV 的感染和致病有密切的关联,并且提示有可能利用趋化因子做为药物阻断 HIV 侵入免疫细胞(Cocchi F, et al. Identification of RANTES, MIP-1, and MIP-1 as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. Science, 15 December 1995, p. 1811)。临床资料分析表明,在一些感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等病理条件下,趋化因子的体内含量可发生明显变化,出现异常性表达,表现为趋化因子及其受体的缺陷,趋化因子表达过度,以及可溶性趋化因子受体水平增加等。因而,检查趋化因子水平有可能对一些疾病进行辅助诊断、病程观察、疗效判断及治疗监测。在临床治疗应用方面,目前已有一些基因工程的趋化因子药物及其相关药物进入临床实验治疗,有望成为新一代的生物技术药物。例如,髓样造血祖细胞抑制因子(MPIF-1)是一种 CC 趋化因子,该因子在肿瘤大剂量放、化疗中有可能被用作造血保护剂发挥治疗效用(Marshall A, HGS launches "first" genomics product in clinic. Nat Biotechnol 1998, 16:129)。

以上表明细胞因子或趋化因子具有十分重要的研究和临床应用意义,因此进一步发现新的细胞因子或趋化因子尤为重要。鉴于人髓样白血病细胞系 U937 在有丝分裂原 PHA 的刺激下能够产生多种已知的细胞因子或趋化因子(Brantschen S, Gauchat JF, de Weck AL et al. Differential expression of cytokine mRNAs in human cell lines. Lymphokine Res 1989 8(3):163-72),而白细胞介素-10(IL-10)具有抑制多种细胞因子表达的功能(Di-Hwei, H et al, Science, 1990, 250, 830),我们利用了 Diatchenko L 等人描述的抑制性递减杂交(SSH)技术。(Diatchenko L, Y FC, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Pro Natl Acad Sci USA. 1996 93:6025-30)从 IL-10 抑制的人髓样白血病细胞系 U937 cDNA 中分离并克隆了新的趋化因子基因。经同源性分析显示,其

核苷酸序列与已知基因的核苷酸序列无明显的同源性。我们利用已建立的实验系统深入研究了该多核苷酸的结构特征，并在原核和真核细胞中成功地表达了由所说的多核苷酸编码的 UCK-1 多肽及其同系物和变异体。生物学活性实验表明本发明的 UCK-1 多肽作为一种分泌性的小分子趋化因子多肽，对多种免疫细胞具有明显的趋化活性，并且对骨髓造血细胞具有促进增殖和集落形成的作用。同时，本发明还发现了 UCK-1 的至少 3 种变异体形式，可能为 UCK-1 mRNA 的不同剪切体。

因此，本发明的一个目的是提供一种具有免疫细胞趋化和造血刺激活性的多肽，及其具有生物学活性的变异体、类似物、衍生物或其片段。

本发明的另一个目的是提供编码本发明多肽的分离的核酸分子，其中包括 mRNA、DNA、cDNA、基因组 DNA 及其类似物和其具有生物学活性的片段。

本发明的再一个目的是提供以重组 DNA 技术生产所说的多肽的方法，该方法包括在适于表达本发明的多肽的条件下培养含有编码所说多肽之核酸序列的重组体原核或真核宿主细胞，然后从培养基和/或溶胞产物中回收所说的多肽。

本发明的再一个目的是提供含有作为活性成分的上述多肽及一种或多种医药上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物。

本发明的再一个目的是提供上述多肽或编码这些多肽的多核苷酸，在生产用于诊断或治疗免疫功能紊乱相关疾病的药物中的应用。

本发明的再一个目的是提供与上述多肽发生特异性免疫反应的多克隆或单克隆抗体。

本发明的再一个目的是提供可用于抑制上述多肽的作用的拮抗剂，以及这些拮抗剂在生产用于治疗类风湿性关节炎、自身免疫病及病毒感染等的药物中的应用。

下列附图是举例显示本发明的实施方案，而不意味着限制本发明的待批要求的范围。

图 1 显示本发明的 UCK-1 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 1) 及由之推测的蛋

白质 UCK-1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)。图 2 显示本发明的多肽的一种变体 UCK-2 的 cDNA 编码区序列 (SEQ ID NO: 3) 及由之推测的蛋白质 UCK-2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4)。图 3 显示本发明的另一种变体 UCK-3 的 cDNA 编码区序列 (SEQ ID NO: 5) 及由之推测的蛋白质 UCK-3 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6)。图 4 显示本发明的另一种变体 UCK-4 的 cDNA 编码区序列 (SEQ ID NO: 7) 及由之推测的蛋白质 UCK-4 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8)。由所示氨基酸序列组成的多肽是已鉴定的成熟形式的多肽(减去起始蛋氨酸残基), 并且其中使用标准的三字母缩写符号表示各氨基酸, 上述序列均已在 GenBank 登记, UCK-1 登记号为 AF096895; UCK-2 登记号为 AF 135380; UCK-3 登记号为 AF 135381; UCK-4 登记号为 AF145216。上述序列将于 99 年 10 月在 GenBank 公布。

图 5 是对 U937 细胞进行白细胞介素-10 抑制表达研究中所使用的抑制性底物杂交 (SSH) 的技术路线示意图。

图 6 显示用于在真核宿主中表达本发明的细胞趋化蛋白质 UCK-1 的重组表达载体 pcDUCK-1, 2, 3, 4 的构建。

图 7 显示本发明的 UCK-1 蛋白质对多种细胞的趋化活性。

图 8 显示本发明的 UCK-1 蛋白质对哺乳动物造血细胞的生长促进活性。

图 9 显示本发明的 UCK-1, 2, 3 蛋白质对小鼠骨髓细胞生长促进活性。

图 10 显示利用反转录-PCR 检测 UCK-1 及其变体 UCK-2, 3, 4 在肿瘤和正常组织的表达。

根据本发明的一个方面, 本发明提供编码具有图 1 (SEQ ID NO: 2) 所示推测的氨基酸序列之成熟多肽的分离的多核苷酸及其突变序列。生物学活性实验显示: 所说的多肽是具有显著的 CC 家族趋化因子的生物学活性的成熟多肽。

可在人的结肠、胰腺、脑、心脏和胚胎组织, 以及相关组织来源的肿瘤中检测到编码 UCK-1 的多核苷酸。该多核苷酸含有编码 99 个氨基酸残基的开放读框(从核苷酸 152 个到 449)。并且可在多种肿瘤组织包括结肠癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌在内的和相应胚胎组织中检测到 UCK-1 的变体 UCK-2, UCK-4 的多核苷酸。UCK-2 多核苷酸编码序列含有编码 152 个氨基酸残基的

放读框 (ORF); UCK-3 多核苷酸编码序列含有编码 67 个氨基酸残基的 ORF; UCK-4 多核苷酸编码序列含有编码 120 个氨基酸残基的 ORF。

本发明的多核苷酸编码序列可以是 RNA 形式的或 DNA 形式的, 其中 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成的 DNA。所说的 DNA 可以是双链或单链的。如果是单链的, 其可以是编码链或非编码(反义)链。

编码成熟多肽的编码序列可以完全相同于 SEQ ID NO: 1 所示的或已保藏的重组体大肠杆菌所携带的编码序列, 或者由于遗传密码子的简并性, 其可以是不同于编码相同成熟多肽及其衍生物的如 SEQ ID NO: 1 所示的或已保藏的重组体大肠杆菌中所携带的 DNA 编码序列。

编码 SEQ ID NO: 2 所示成熟多肽的多核苷酸可以只包括成熟多肽的编码序列或包括成熟多肽的编码序列和附加编码序列、成熟多肽的编码序列和非编码序列, 例如内含子或成熟多肽之编码序列的 5'和/或 3'端非编码序列。

本发明进一步涉及编码具有 SEQ ID NO: 2 所示推测的氨基酸序列之多肽或由已保藏的重组体大肠杆菌所携带的 cDNA 编码之多肽的片段、类似物及衍生物的上述多核苷酸的变异体, 多核苷酸的变异体可以是该多核苷酸的天然存在的等位基因变异体、mRNA 不同剪切变异体或其非天然存在的变异体。这样的变异体也可以是编码与具有如 SEQ ID NO: 2 所示推测的氨基酸序列的多肽有相同或相似生物学活性之多肽的缺失变异体、取代变异体及加入或插入变异体。所说的等位变异体是可以带有核苷酸取代、缺失或加入的, 但实质上没有改变所编码之多肽的功能的多核苷酸序列的可替代形式。本发明的 UCK-2 编码序列 (SEQ ID NO: 3,)、UCK-3 (SEQ ID NO: 5) 和 UCK-4 (SEQ ID NO: 7) 即属于此类变异体形式的多核苷酸序列。由这些变异的核苷酸编码序列编码的 UCK 变异体可以在功能上与本发明的 UCK-1 相同、相似或不同。

可以使用本发明全长基因的小片段作为 cDNA 文库的杂交探针, 以从 cDNA 文库分离全长基因及其与本发明的 UCK 基因有高度序列同源的核苷酸序列。这些探针一般至少有 30 个碱基, 并且也可含有多达 50 个以上的碱基。可使用这些探针鉴定相当于全长转录物和含有完整基因之基因组克隆的 cDNA 克隆。方法包括根据已知的 DNA 序列合成寡核苷酸探针, 并在杂交条件下使用含有与本发明的基因互补之 DNA 序列的标记的寡核苷酸与人 cDNA 基因组 DNA

或 RNA 文库杂交，从中分离出文库中与探针杂交所需要的核苷酸序列。

本发明还涉及与上述序列至少有 70%，较好 90%，最好 95% 序列相同性的序列杂交的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与上述多核苷酸杂交的多核苷酸。所说的“严格条件”是指只有当序列间至少有 95% 相同性时才发生杂交的杂交条件。与上述多核苷酸杂交的多核苷酸最好是编码与 SEQ ID NO: 1 所示 cDNA 编码的成熟多肽有基本上相同生物学活性之多肽的多核苷酸。

另外，与本发明的多核苷酸杂交的多核苷酸可以是至少有 10 碱基，最好有 30 个碱基的连续序列，并且可以有或没有保留活性的。可使用这样的多核苷酸作为回收或探查 SEQ ID NO: 1 所示多核苷酸的探针，或作为诊断探针，或作为聚合酶链反应(PCR)引物。

因此，本发明涉及与编码 SEQ ID NO: 2 所示多肽的多核苷酸至少有 70%，最好有 90% 相同性的多核苷酸及其至少有 10 个碱基，最好有 30 个碱基的片段，以及由这样的多核苷酸编码的多肽。

本发明进一步涉及具有免疫细胞趋化活性和造血细胞刺激活性的本发明命名为 UCK-1 的多肽，该多肽具有如 SEQ ID NO: 1 所示的推测的氨基酸序列或具有由已保藏的重组体大肠杆菌所携带的多核苷酸序列编码的氨基酸序列，以及这些多肽的具有基本上相同功能或活性的片段、类似物和衍生物，并且其中所说的衍生物包括提高了或降低了生物学功能的多肽。

本发明的多肽可以是重组的多肽，天然多肽或合成的多肽，但最好是重组的多肽。

具有图 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽或由已保藏的生物材料携带的 cDNA 编码的多肽的片段、衍生物或类似物可以是其中的一个或多个氨基酸残基包括有取代基的，或者其中成熟的多肽是与其他化合物，如用于提高该多肽之半寿期的化合物(如聚乙二醇或脂质)相融合的，或者其中为纯化该成熟多肽而在其侧翼融合有附加氨基酸序列的多肽片段、衍生物或类似物。

本发明的多肽或多核苷酸最好是以分离的形式提供的，并且最好是纯化成均质材料的。所说的“分离的”是指已离开了其原有环境，如离开了活的生物体的或已离开其部分或全部共存材料的多肽或多核苷酸。这样的多核苷酸可以是某种载体的一部分，和/或这样的多核苷酸可以是某种组合物的一部分，因为

此时这样的载体或组合物已不是其天然环境的一部分，所以所说的多肽或多核苷酸仍是被分离的。

本发明的多肽包括如 SEQ ID NO: 2 所示的多肽，以及与之至少有 70% 同源性，较好有 90% 同源性，最好有 95% 同源性或相似性的多肽，并且包括这些多肽的一部分，其中所说多肽的一部分一般至少包括 20 个氨基酸，较好包括至少 40 个氨基酸。如众所周知，两个多肽的“同源性”或“相似性”是通过将一种多肽的氨基酸序列和其保守的氨基酸取代物与第二种多肽的序列相比较而确定的。

可使用本发明多肽的片段或其一部分作为中间体，以肽合成法制备相应的全长度多肽，也可使用本发明多核苷酸的片段或其部分来合成本发明的全长度多核苷酸。

本发明还涉及携带所说的多核苷酸的载体、用该载体转化或转染的宿主细胞，以及以重组 DNA 技术生产本发明多肽的方法。

可用携带本发明多核苷酸的克隆载体或表达载体转导、转化或转染适当的宿主细胞。所用的载体例如可以是质粒、病毒颗粒或噬菌体形式的。可在为活化启动子、选择转化体或扩增所需的 UCK-1 基因而适当修饰的常规营养培养基中培养被转导、转染或转化的宿主细胞。培养中所使用的温度、pH 等培养条件一般都是由所选用的表达特定蛋白质的宿主细胞决定的，并且这些条件都是本领域技术人员熟知的。

可按重组 DNA 技术使用本发明的多核苷酸生产本发明具有免疫细胞趋化活性和造血细胞刺激活性的多肽。为此，可将所说的多核苷酸插入到各种用于表达该多肽的适当表达载体中。这样的载体包括染色体、非染色体来源的或合成的 DNA 序列，例如 SV40 的衍生物、细菌质粒、噬菌体 DNA、酵母质粒、噬菌粒(由质粒和噬菌体 DNA 组合体衍生的载体)、以及病毒(如杆状病毒、牛痘病毒、腺病毒、家畜痘病毒)DNA，条件是这些载体能够在所选择的宿主细胞中复制并存活。

可用各种已知的方法将适当的 DNA 序列插入到载体的适当限制性核酸内切酶位点中。插入到表达载体中的 DNA 序列被可操作地连接到适当的表达控制序列即启动子上，以指导 mRNA 合成。这样的启动子的例子包括 RSV、HIV、

CMV 或 SV40 启动子, 大肠杆菌 lac 或 trp 启动子、噬菌体 λP_L 启动子及在原核或真核细胞或其病毒中控制基因表达的其他启动子。

此外, 表达载体可含有启动翻译的核糖体结合位点及转录终止子, 并含有一个或多个选择标志基因, 以提供被转化之宿主细胞的可选择表型特征, 如适用于真核细胞的新霉素抗性或二氢叶酸还原酶基因, 或适用于大肠杆菌中的氨苄青霉素或四环素抗性基因。

可用含有上文所述适当 DNA 序列, 以及适当启动子或其他转录与翻译控制序列的载体转化适当的宿主细胞, 以使宿主表达所需的蛋白质。

可使用任何适当的宿主细胞表达本发明的多核苷酸, 可提到的适当宿主的例子有: 细菌细胞如大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌等; 真菌细胞如酵母细胞; 昆虫细胞如果蝇和中国家蚕细胞; 哺乳动物细胞如 CHO、COS 和 HEK293 细胞; 以及人细胞如 TF-1 细胞、U937 细胞和 HeLa 细胞。

具体地说, 本发明涉及包括上述一个或多个多核苷酸序列的重组构建体, 该构建体包括在其中以正向或反向插入了本发明的多核苷酸序列的载体, 如质粒或病毒载体, 并且在所说的多核苷酸序列的上游可操作地连接了适当的调节序列如启动子序列和增强子序列。

适用的载体的例子包括用于真核细胞的 pMT-hIL-3(马大龙, 狄春辉, 庞健等, (1991) 高技术通讯 11: 26-29)、pQE-9(Qiagen)、pD10、pNH18A(Stratagene)、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia); 以及适用于真核细胞的 pcDNA3、pCI、pWLNEO、pSG(Stratagene)、pSVL(Pharmacia)。适用的启动子包括 lacI、lacII、T7、 λP_L 和 trp 等细菌启动子, 以及 CMV、SV40、HSV 胸苷激酶等真核细胞启动子。

在一个实施方案中, 本发明进一步涉及含有上述构建体的宿主细胞。宿主细胞可以是高等真核细胞如哺乳动物细胞或人肿瘤细胞, 或者是低等真核细胞如酵母细胞, 或者是原核细胞如大肠杆菌细胞。可用本领域已知的方法如氯化钙转染法、脂质体转染法、电穿孔法或微粒轰击法将所说的构建体导入宿主细胞内。

可按常规方法使用包含在宿主细胞中的构建体产生由重组 DNA 序列编码的多肽产物。或者, 也可使用常规的肽合成仪化学成本发明的多肽。或者,

也可使用衍生于本发明的 DNA 构建体的 mRNA, 在无细胞翻译系统中产生所需的蛋白质。

必要时, 为了提高编码本发明多肽的 DNA 在高等真核细胞中的转录效率, 可在载体中插入增强子序列。增强子一般是约含 10-300 个碱基对并作用于启动子以增强 DNA 转录的顺式作用元件。另外, 必要时也可在启动子和下游结构序列之间插入一个能指导翻译产物向周质或细胞外培养基中分泌的前导序列(分泌信号)。或者, 可根据需要导入编码融合蛋白质的异源 DNA 序列, 所说的融合蛋白质可包括一个赋予所需特征, 如用于稳定被表达之产物的或简化其纯化步骤的 N 末端识别肽。

适用于原核细胞的市售表达载体一般均带有可选择标志和细胞复制原点, 以及已知克隆载体 pBR322(ATCC 37017)的其他遗传元件。这样的市售载体包括 pGEM (Promega) 和 pKK223-3 (Pharmacia)。可根据所选用的适当启动子和待表达的结构基因序列来选择衍生于 pBR322 的适当载体。

在转化宿主细胞并在被转化的宿主细胞生长到适当的细胞密度后, 用适当的方法(如温度变动或化学物质诱导)诱导启动子, 然后继续培养之。培养完成后, 可用离心法收集细胞, 并用任何已知的方法, 如冻融法、超声处理法、溶菌酶溶解法或机械破碎法破碎细胞。

也可用各种哺乳动物细胞表达本发明的重组蛋白质。哺乳动物表达系统的例子包括人肿瘤细胞系, 如 HeLa、TF-1 和 U937 细胞系, 以及 COS、CHO 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体可含有复制原点、适当的启动子和增强子、多聚腺苷酸化位点、切接供体和受体位点、转录终止序列, 及 5'侧翼非编码序列。可使用衍生于 SV40 的切接和聚腺苷酸化位点的 DNA 序列来提供必要的遗传元件。

可以用各种已知的方法从宿主细胞培养物中回收和纯化本发明的 UCK-1 及其变异体多肽, 这些方法包括硫酸铵或乙醇沉淀法、酸萃取法、超滤法、离子交换层析法、磷酸纤维素层析法、疏水相互作用层析法、凝胶过滤法、亲和层析法及高压液柱层析法。

本发明的多肽可以是天然来源纯化的或化学合成的, 或以重组 DNA 技术由原核或真核宿主产生的。根据重组生产方法中所用宿主的不同, 本发明的

多肽可以是糖基化的或非糖基化的，并且可以包括一个起始蛋氨酸残基。

利用 RT-PCR 技术检测 UCK-1 在不同组织的表达，发现了 UCK-1 在多种细胞中均有表达，特别令人惊奇的是，我们发现在某些细胞中存在有 UCK-1 的变异体形式。对这些变异体基因的克隆化和序列分析，证明它们分别编码 152 个、67 个和 120 个氨基酸，分别将其命名为 UCK-2、UCK-3 和 UCK-4 蛋白质。据我们推测，这些变异体很可能是 UCK-1 基因的不同的剪切形式。特别是发现 UCK-2 在多种原发性肿瘤细胞和胚胎细胞中高表达，而正常细胞中的表达水平则相对较低。因此，它们的存在对于肿瘤发生研究和临床诊断将具有重要的潜在价值。

在实施例中，用一个已构建的携带编码 UCK-1 多肽之多核苷酸序列的重组表达载体 (pcDI-UCK-1, pcDI-UCK-2, pcDI-UCK-3) 转染 COS-7 细胞后，经生物活性分析研究培养物和细胞裂解物的趋化作用，发现 UCK-1, 2, 3 系分泌性蛋白。上述这些结果提示该多肽为分泌性的具有趋化活性的趋化因子，在免疫调节和造血调节中发挥重要作用。

由于本发明的多肽具有多种生物学活性，因而具有多方面的应用价值，例如：

本发明的基因工程的重组 UCK-1 及其变异体由于可具有造血刺激效应，有可能利用本发明在造血系统疾病的治疗方面发挥作用，包括原发性或继发性造血功能障碍等。

本发明的基因工程的重组 UCK-1 及其变异体由于可具有免疫细胞趋化活性，有可能将其应用于肿瘤和感染性疾病的治疗。

本发明的 UCK-1 及其变异体的基因导入体内，特别是导入肿瘤细胞作为肿瘤疫苗，有可能作为新的基因治疗手段在肿瘤治疗发挥疗效。

由于本发明发现 UCK-1 和 UCK-2 基因在肿瘤中高表达，从而为进一步了解其在肿瘤发病的作用，将其用于肿瘤检测和肿瘤治疗目的提供了必要的基础。

由于 UCK-1 及其变异体的可具有炎症细胞趋化作用 (参见图 4)，有可能将其做为抗炎症治疗的药物新靶点，通过抗 UCK-1 及其变异体抗体或其它封闭剂治疗自身免疫性疾病。

由于本发明的 UCK-1 及其变异体具有体内刺激骨骼肌细胞增殖的作用 (参见实施例 8)，有可能利用其治疗各种原因造成肌肉萎缩或其他退行性病变。

由于本发明的 UCK-1 及其变体具有体内刺激骨骼肌细胞增殖的作用(参见实施例 8),而在 DNA 疫苗或 DNA 药物直接肌肉注射表达时,增殖中的骨骼肌更易于接受 DNA,因而可将 UCK-1 及其变体与 DNA 疫苗或 DNA 药物同时或先后注射,以促进 DNA 疫苗或 DNA 药物的免疫及治疗效果。

由于本发明的 UCK-1 及其变体具有体内刺激毛囊细胞增殖的作用,有可能利用其促进毛囊增生,治疗脱发症。

可使用本发明的多肽,其片段或类似物或衍生物,或携带其编码序列并表达这些多肽的细胞作为免疫原,以生产该多肽的抗体。这些抗体可以是多克隆或单克隆抗体,并且包括嵌合的、单链的和人源化的抗体及其 Fab 片段。可用各种已知的方法生产这些抗体和其片段。以常规方法得到的抗体可与多肽本身结合。一般说来,使用只编码本发明的多肽一部分的序列产生的抗体也能够与整个天然多肽结合。然后可用这样的抗体从表达本发明多肽的组织材料中分离所需的多肽。

可用杂交瘤技术(Kohler and Milstein, Nature 256:495-497,1975)或人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., Immunology Today 4:72,1983)生产人单克隆抗体。另外,可用转基因小鼠来表达抗本发明的免疫原性多肽产物的人源化抗体。

另外,可用反义技术制备反义构建体,通过三股螺旋形成反义 DNA 或 RNA 来控制基因表达。例如,可使用编码本发明多肽之多核苷酸序列的 5'编码部分设计 10-30bp 长度的反义 RNA 寡核苷酸。也可设计与基因的转录区域互补的 DNA 寡核苷酸,从而借以阻止表达产物的转录和产生(参见 Cooney et al., Science 241:456,1988; Dervan et al., Science 251:1360,1991)。反义 RNA 寡核苷酸在体内与 mRNA 杂交并阻断 mRNA 分子的翻译。

可使用本发明的多肽或其拮抗剂作为基本活性成分,与一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂混合,制成药物组合物。根据治疗目的和给药途径,以及使用方法的不同,可使用不同的载体或赋形剂将本发明的药物组合物制成各种不同的剂型。例如可制成适于各种给药途径,特别是胃肠道外途径给药的溶液剂、脂质体包裹剂、微胶囊剂及其他缓释制剂。使用的载体或赋形剂包括但不限于生理盐水、等渗葡萄糖溶液、缓冲盐水、甘油、乙醇和其组合。可根据需要,在本发明的组合物中加入一种或多种其他辅助成分,例如有与本发明

的 UCK-1 有协同作用的其他天然的、合成的或重组的活性化合物，以及选自人血清白蛋白、低分子量肽、氨基酸(如甘氨酸或赖氨酸)和金属阳离子(如 Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 和 Ca^{2+}) 的蛋白质保护剂；选自聚乙二醇、羧甲基纤维素、多聚甘氨酸、谷胱甘肽的稳定剂；以及适当的蛋白酶抑制剂。在粘膜或皮肤局部给药的情况下，所说的组合物可含有例如选自二甲基亚砷和月桂氮卓醇的皮肤渗透剂，以及适当的自由基清除剂。

为了使用上的方便和便于维持组合物各成分特别基本活性成分的生物活性，可将本发明的药物组合物制作成药盒的包装形式，这样的药盒可包括一个或多个装有本发明药物组合物之一或多种成分的容器，并在每个容器上按政府制药管理机构指定的形式注明有关药物的使用或销售的批号及相关信息。

可通过常规途径，特别是胃肠道外途径投用本发明的药物组合物，例如通过静脉内、腹腔内、肌肉内、皮内、皮下或粘膜内途径给药。本发明药物组合物的有效剂量范围可从几微克到几毫克/公斤体重/天，但针对每个特定病人的具体用药剂量应根据待治疗疾病或病理状态的性质及严重程度、病人的年龄、体重、一般健康状况及给药方式等因素由临床医生来确定。

也可以根据本发明在体内表达本发明的多肽，即以所谓的“基因治疗”方法使用这些多肽。例如，可以用编码本发明多肽的多核苷酸于体外基因工程化处理病人的细胞，然后再将工程化改造的细胞导入欲用所说的多肽治疗的病人体内。例如可使用含有编码本发明多肽的 RNA 反转录病毒颗粒来转染并工程化改造所说的在体内表达本发明多肽的细胞。可按已知方法将产生含有编码本发明多肽之反转录病毒颗粒的生产细胞投用于病人体内，以在体内对细胞进行基因工程化改造并在体内表达所说的多肽。

上述这些方法以及用于这些方法的反转录病毒、包含在载体内的适当的启动子、包括启动子和处于适当启动子控制下之多核苷酸编码序列的载体、用于转染包装细胞系以形成生产细胞系的反转录病毒质粒载体，以及适当的可被转染的包装细胞都是基因治疗领域中已知的。

可借助各种已知的方法用携带本发明多肽之核酸编码序列的载体体外或体内转染包装细胞或靶细胞。这些方法包括但不只限于电穿孔、微粒轰击(例如使用 Biolistic 装置)、脂质体转染法，以及磷酸钙沉淀法或这些方法的联合使用。

另外,也可以将反转录病毒载体包裹在脂质体中,或者偶联到脂质体上,然后再运送到宿主细胞的适当靶细胞内。

总之,可由生产细胞系产生包含本发明多肽之核酸编码序列的感染性反转录病毒载体颗粒,然后使用这样的载体颗粒于体外或体内转导宿主真核细胞。被转导的真核细胞将表达编码所说多肽的核酸序列。可被转导的真核细胞包括但不只限于胚胎干细胞、胚胎瘤细胞和成人癌细胞,以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、间质细胞、上皮细胞及表皮细胞。

本发明还涉及使用本发明的多核苷酸作为诊断试剂,检测突变形式的基因以诊断因体内 UCK-1 表达不足或表达过量所导致的疾病或病理状态。

可用各种技术在 DNA 水平上检测携带 UCK-1 基因突变的个体。可从病人的体液中,如血液、尿液、唾液或活体或尸检材料中得到用于诊断试验的核酸。可以使用基因 DNA 或 RNA 直接进行检测,也可以使用 PCR 方法(Saiki et al., Nature 324:163-166,1986)扩增 DNA 后再进行检测。例如,可使用与编码本发明多肽的核酸互补的 PCR 引物鉴定和分析待检材料中相应基因的突变,如可与正常基因型相比较并根据扩增产物的大小改变来确定待检基因的缺失或插入。可将扩增的 DNA 与放射标记的 UCK-1 及其变异体 RNA 或反义 DNA 序列杂交,以鉴定点突变。

可用直接 DNA 测序法分析参考基因和突变基因之间的序列差异。另外,也可利用克隆的 DNA 片段作为探针并结合 PCR 方法,以高敏感性和特异性来检测特定的 DNA 片段,例如可联合使用测序引物和由扩增的 PCR 产物产生的单链 PCR 产物或单链模板分子。

可以在含有或不含变性剂的凝胶,特别是高分辨率凝胶中检测 DNA 的电泳迁移率来完成基于 DNA 序列差异的遗传学试验。可在变性甲酰胺梯度凝胶上区分不同序列的 DNA 片段(如参见 Myers et al., Science 230:1242,1985)。另外,也可用核酸酶保护检测法或化学裂解法(如参见 Cotton et al., PNAS, USA, 85:4397-4401,1985)揭示特定部位的序列改变。

本发明还涉及检测各种组织中 UCK-1 及其变异体蛋白质水平改变的诊断试验法。用于检测得自宿主体内之样品中的 UCK-1 及其变异体蛋白质水平的检测法是本领域技术人员已知的,并包括放射免疫法、竞争性结合法、Western 印

迹分析法及酶联免疫吸附法(ELISA)。其中优选的方法是 ELISA 法。

本发明的多核苷酸序列对于染色体鉴定也是有价值的。该序列可特异地定位于个别人染色体的特定位置并可与之杂交。按照本发明,对本发明的 DNA 进行染色体作图是将这些序列与疾病相关基因联系起来的第一个重要步骤。

可从 cDNA 制备 PCR 引物以进行序列的染色体作图。对基因的 3'非翻译区进行计算机分析,以迅速选择出跨越基因组 DNA 中一个以上外显子并从而加入扩增过程中的引物。然后使用这些引物以 PCR 法筛选含有个别人染色体的体细胞杂种。只有那些含有对应于引物之人类基因的杂种才产生扩增的片段。对体细胞杂种进行 PCR 作图是一种指定特定 DNA 在特定染色体上的位置的便利方法。在按照本发明使用同样的寡核苷酸引物的情况下,可用一组得自特定染色体的片段或大的基因组克隆群体按相似方法完成亚定位。然后再用荧光原位杂交法(FISH)对 cDNA 克隆进行精确的染色体定位(参见 Verma et al., Human chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, NY (1988))。

一旦完成了序列的精确染色体定位作图,即可将该序列的物理位置与遗传图数据联系起来。然后通过连锁分析(物理相邻基因的共遗传)来鉴定作图定位于同一染色体区域上的基因与疾病之间的关系。然后,可确定受损或未受损个体间的 cDNA 或基因组 DNA 的差异。如果在某些或全部受损个体中观察到突变,而正常个体中没有观察到这种突变,则该突变便很可能是致病因素。

以下借助实施例进一步举例描述本发明,但应明确的是,这些实施例并不以任何方式构成对本发明待批权利要求范围的限制。

实施例 1: 从 U937 细胞 cDNA 中分离 IL-10 抑制的相关基因

根据文献报道,IL-10 是一种细胞因子合成抑制因子(CSIF),可对多种来源的细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF 等产生抑制效应,(Di-Hwei, H et al, Science, 1990, 250, 830)。推断 IL-10 抑制的基因中,必然有目前尚未发现的细胞因子或趋化因子,因而采用文献中报导的抑制性递减杂交(SSH)技术(参见 Diatchenko L, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Pro Natl Acad Sci USA.1996 93:6025-30)从 U937 细胞中分离 IL-10 抑制的细胞因

子候选基因。

以 $10\mu\text{g/ml}$ PHA 刺激 8 小时的 U937 细胞为试验者 cDNA (Tester cDNA) 来源, 以同样浓度 PHA 刺激并同时加 100ng/ml IL-10 抑制的 U937 细胞为驱动者 cDNA (Driver cDNA) 来源。计数并调整两种 cDNA 来源细胞数一致, 达到 1×10^7 个/ml。

细胞总 RNA 的提取是利用 GIBCO-BRL 公司的 TRIzolTM 试剂; mRNA 的提取是利用 Pharmacia 公司的 Quick Prep Micro mRNA purification kit, 详细操作过程均按说明书进行。提取的总 RNA 复溶于无 RNase 的水中, 分光光度计 (Beckman 640) 定量后, 用于 Northern blot 杂交和文库构建。

采用 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 提供的寡核苷酸、试剂和酶, 分别以上述 Driver 和 Tester mRNA 为模板, 进行单链及双链 cDNA 的合成。

SSH 差示杂交详细操作过程按说明书进行。利用 glassmilk 将 PCR 扩增产物即差异 cDNA 片段回收并克隆到 PGEM-T easy 载体中, 连接产物转化 XL1-Blue 菌, 挑阳性克隆, 用 PEG 沉淀方法纯化质粒 DNA, 然后利用自动 DNA 测序仪进行序列分析。将测序所得到的序列通过国际互连网在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行同源性比较, 与数据库同源性低于 90% 的序列为新基因, 通过 GenBank 中的 BankIt 功能进行新基因登记。其中一个可能有某些重要功能的基因定名为 UCK-1 (该基因在 GenBank 的登记号为 AF096895)。

实施例 2: UCK-1 mRNA 表达的 Northern blot 检测

使用 TriZOLTM 试剂盒 (GIBCO-BRL Co.) 提取各大约 1×10^7 个 PHA 刺激培养 8 小时后的 U937 细胞及相同数目 PHA 刺激培养, 并加 100ng/ml IL-10 抑制的 U937 细胞的总 RNA。提取的总 RNA 经分光光度计 (Beckman 640) 定量后, 按文献 (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) "Molecular cloning: a Laboratory manual" 2nd edition, pp343-374, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA) 所述方法并使用随机引物荧光素标记试剂盒 (Dupont NEN NEL803) 进行 Northern 杂交。结果显示 UCK-1 在 PHA 培养 8 小时后的 U937 细胞中高表达, IL-10 能够抑制

其表达, 其分子量大小为约 500bp。

实施例 3: UCK-1 全长 cDNA 的序列和结构特征

通过 SSH 得到了得到 UCK-1 全长 cDNA 序列, 大小与上述 Northern 杂交结果相吻合。以 PHA 刺激 8 小时和 PHA 刺激同时 IL-10 抑制 8 小时的 U937 细胞文库为模板, 利用 UCK-1 特异引物, 扩增 UCK-1 全长 DNA, 得到预期的全长, 所获序列是正确的, 且该基因的表达可被 IL-10 所抑制, 同时发现该基因在 PHA 刺激的 U937 细胞中至少有三种不同的剪切形式。

获得的 UCK-1 的 cDNA 序列分析发现, UCK-1 全长 cDNA 为 534bp, 包括 Poly A 序列及 "ATTAAA" 加尾信号 (图 1, 上行)。根据序列分析, UCK-1 从第 152 个碱基开始编码 99 个 aa 的开放读码框架 (图 1)。利用 Prosite 计算机软件分析推测的氨基酸序列, 未发现穿膜区序列、DNA 结合位点及 N-糖基化位点, 也没有发现信号肽, 但真核细胞表达上清液的活性分析证明 UCK-1 蛋白可以分泌到细胞外, 属于分泌性蛋白 (参见实施实例 4)。对氨基酸序列进行同源性分析发现 UCK-1 的 35-79 位氨基酸与线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 amino acid permease 蛋白有 46% 的同源性, 与其它的基因和蛋白无同源性, 表明 UCK-1 为新的基因。在 UCK-1 蛋白质结构中存在 2 个连续的半胱氨酸 (CC) 的结构特点, 这种结构往往出现于 CC 家族的趋化因子中, 提示 UCK-1 可能为一种的趋化因子, 但 UCK-1 与目前已知的任何趋化因子均无明显的同源性, 因而需进行功能实验方能进一步确定 UCK-1 是否属于 CC 型趋化因子。

实施例 4: UCK-1, 2, 3, 4 蛋白质的真核细胞表达

利用 PCR 技术从 PHA 刺激的 U937 细胞 cDNA 文库中扩增得到 UCK-1, 2, 3, 4 基因的完整开放读码框架序列, 并将其克隆到 pGEM-T easy 载体中。用限制性核酸内切酶 EcoRI 将插入片段释放出来, 克隆到真核表达载体 pcDI 的 EcoRI 位点中, 筛选正向插入克隆, 经内切酶鉴定正确, 命名为 pcDI-UCK1, 2, 3, 4。使用 Qiagen 公司的质粒纯化系统纯化质粒, 应用 Qiagen 公司的高效转染试剂 Superfect 瞬时转染 COS-7 细胞, 收集转染上清, 用作活性分析。用于扩增 UCK-1, 2, 3, 4 编码区的引物序列如下:

5' ATG GAT AAC GTG CAG CCG AAA AT 3'

5 CCG CTC GAG TTA CAA AAC TTC TTT TTT TTC 3

实施例 5: UCK-1 蛋白质的趋化实验

利用 Ficoll-hypaque(1.077)分层液分离外周血单个核细胞和嗜中性粒细胞, 用 NH₄CL-Tris 溶解红细胞, U937 细胞, K562 细胞, HL-60 细胞常规培养, 用 1.3% 的 DMSO 刺激 HL-60 细胞 4 天, 得到向嗜中性粒细胞系分化的 HL-60 细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 备作趋化实验。将转染上清作倍比稀释, 加到趋化小室下层孔中, 把准备好的细胞加到趋化小室上层孔中, 按要求装好趋化小室, 嗜中性粒细胞孵育 1 小时, 其余细胞孵育 3 小时, 取膜, 刮去非特异细胞, 甲醇固定, Giemsa 染色, 40 倍镜下, 随机选 5 个视野记数, 取平均值, 将 UCK-1 上清组趋化的细胞数与转染 pcDI 载体组上清组趋化的细胞数相比, 即得到趋化指数。结果如图 7 所示, UCK-1 对中性粒细胞、单个核细胞、U937 细胞、K562 细胞及 DMSO 刺激的 HL-60 细胞均有明显趋化作用。

实施例 6: UCK-1 对正常人低密度骨髓细胞生长的影响

利用 Ficoll-hypaque(1.077)分离正常人低密度骨髓细胞, 用无血清 1640 洗 2 次, 稀释为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 取 $90 \mu\text{l}$ 加到 96 空培养板中, 各作 3 个复孔, 对照组加 $10 \mu\text{l}$ 1640, GM-CSF 组加入 $10 \mu\text{l}$ 20ng/ml GM-CSF, UCK-1 和 pcDI 组各加相应的转染上清, 培养 5 天, 加入 MTT, 测 OD570, 结果发现: UCK-1 能促进骨髓细胞的增殖, 其作用强度类似于 20ng/ml GM-CSF (图 8)。

实施例 7: UCK-1, 2, 3 对小鼠骨髓细胞生长的影响

无菌取 Balb/c 小鼠骨髓细胞, 用 Tris-NH₄Cl pH7.2 溶解红细胞, 调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 。对照组加 $10 \mu\text{l}$ 正常 COS-7 细胞培养上清, 阳性对照组加小鼠 IL-3 和 SCF, 其它各组加 $10 \mu\text{l}$ pcDI, UCK-1, UCK-2 和 UCK-3 转染上清, 培养 90 小时, 加入 MTT, 测 OD570, 结果发现: UCK-1, UCK-2 能明显促进小鼠骨髓细胞的增殖, UCK-3 作用不明显 (图 9)。

实施例 8: UCK-1 在正常细胞和肿瘤细胞的表达及其变异体 UCK-2、UCK-

3、UCK-4 的发现

为分析 UCK-1 在各种胚胎组织, 成人组织及肿瘤组织的表达水平和剪切形式, 以 Clontech 公司 Multiple Tissue cDNA Panels 试剂盒提供的单链 cDNA 文库作模板, 利用 UCK-1 编码区特异性引物(同构建 pcDI 载体的引物), 进行 PCR 扩增, 发现 UCK-1 在多种胚胎组织和肿瘤组织高表达, 且存在多种不同的变异体, 而在正常成人组织中表达水平低或不表达(图 10)。说明该基因可能与胚胎发育及肿瘤的发生有密切关系。

实施例 9: UCK-1 基因在哺乳动物体内的表达及生物活性的研究

选择 4-6 周龄的 BABL/c 小鼠为实验动物。利用 Qiagen 公司的质粒纯化系统纯化真核表达质粒 pcDI-UCK1, 应用基因直接注射的方法将 pcDI-UCK1 注射至小鼠肌肉组织及皮下组织 ($100\mu\text{g}/\text{只}$)。注射后第 10 天、第 30 天分别采取注射局部的小鼠肌肉组织及皮下组织, 通过组织学、免疫组织化学、酶学等方法观察 pcDI-UCK1 表达产物在注射组织局部的生物学效应。结果发现 pcDI-UCK1 表达产物具有: ①趋化炎症细胞至注射局部组织的作用; ②促进骨髓肌细胞增殖及分化的作用; ③促进毛囊角质细胞增殖及分化的作用。

序列表

(1)、一般信息

(i) 申请人: 北京医科大学、北京北医联合生物工程公司

(ii) 发明名称: 具有免疫细胞趋化作用和造血刺激作用的新趋化因子

(iii) 序列数: 6

(iv) 通讯地址:

(A) 联系人: 马大龙

(B) 街道: 海淀区学院路 38 号

(C) 城市: 北京

(D) 国家: 中华人民共和国

(E) 邮编: 100083

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 3.5 英寸软盘

(B) 计算机: 奔腾 166MMX

(C) 操作系统: WINDOWS 95

(D) 软件: WORD 97

(vi) 电讯信息:

(A) 电话: 86-10-62091149

(B) 电传: 86-10-62091149

(1) SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 534 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 1

	3	9	15	21	27	33	39	45							
1	GTT	CCC	AAT	CTG	AAG	TGA	AGC	CGA	GCT	GGG	CGA	GAA	GTA	GGG	GAG
46	GGC	GGT	GCT	CCG	CCG	CGG	TGG	CGG	TTG	CTA	TGC	CTT	CGC	AGA	ACC
91	TAC	TCA	GGC	AGC	CAG	CTG	AGA	AGA	GTT	GAG	GGA	AAG	TGC	TGC	TGC
136	TGG	GTC	TGC	AGA	CGC	GAT	GGA	TAA	CGT	GCA	GCC	GAA	AAT	AAA	ACA
181	TGC	CCC	CTT	CTG	CTT	CAG	TGT	GAA	AGG	CCA	CGT	GAA	GAT	GCT	GGC
226	GCT	GGA	TAT	TAT	CAA	CTC	ACT	GGT	AAC	AAC	AGT	ATT	CAT	GCT	CAT
271	CGT	ATC	TGT	GTT	GGC	ACT	GAT	ACC	AGA	AAC	CAC	AAC	ATT	GAC	AGT
316	TGG	TGG	AGG	GGT	GTT	TGC	ACT	TGT	GAC	AGC	AGT	ATG	CTG	TCT	TGC
361	CGA	CGG	GGC	CCT	TAT	TTA	CCG	GAA	GCT	TCT	GTT	CAA	TCC	CAG	CGG
406	TCC	TTA	CCA	GAA	AAA	GCC	TGT	GCA	TGA	AAA	AAA	AGA	AGT	TTT	GTA
451	ATT	TTA	TAT	TAC	TTT	TTA	GTT	TGA	TAC	TAA	GTA	TTA	AAC	ATA	TTT
496	CTG	TAT	TCT	TCC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA

(2) SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 99 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 2

				5					10					15	
1	Met	Asp	Asn	Val	Gln	Pro	Lys	Ile	Lys	His	Arg	Pro	Phe	Cys	Phe
16	Ser	Val	Lys	Gly	His	Val	Lys	Met	Leu	Arg	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn
31	Ser	Leu	Val	Thr	Thr	Val	Phe	Met	Leu	Ile	Val	Ser	Val	Leu	Ala
46	Leu	Ile	Pro	Glu	Thr	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Gly	Val	Phe
61	Ala	Leu	Val	Thr	Ala	Val	Cys	Cys	Leu	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Ile
76	Tyr	Arg	Lys	Leu	Leu	Phe	Asn	Pro	Ser	Gly	Pro	Tyr	Gln	Lys	Lys
91	Pro	Val	His	Glu	Lys	Lys	Glu	Val	Leu						

图 1

(1) SEQ ID NO: 3 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 459 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 3

```

      3       9       15       21       27       33       39       45
      |       |       |       |       |       |       |
1   ATG GAT AAC GTG CAG CCG AAA ATA AAA CAT CGC CCC TTC TGC TTC
46  AGT GTG AAA GGC CAC GTG AAG ATG CTG CGG CTG GCA CTA ACT GTG
91  ACA TCT ATG ACC TTT TTT ATC ATC GCA CAA GCC CCT GAA CCA TAT
136 ATT GTT ATC ACT GGA TTT GAA GTC ACC GTT ATC TTA TTT TTC ATA
181 CTT TTA TAT GTA CTC AGA CTT GAT CGA TTA ATG AAG TGG TTA TTT
228 TGG CCT TTG CTT GAT ATT ATC AAC TCA CTG GTA ACA ACA GTA TTC
271 ATG CTC ATC GTA TCT GTG TTG GCA CTG ATA CCA GAA ACC ACA ACA
316 TTG ACA GTT GGT GGA GGG GTG TTT GCA CTT GTG ACA GCA GTA TGC
361 TGT CTT GCC GAC GGG GCC CTT ATT TAC CGG AAG CTT CTG TTC AAT
406 CCC AGC GGT CCT TAC CAG AAA AAG CCT GTG CAT GAA AAA AAA GAA
451 GTT TTG TAA
  
```

(2) SEQ ID NO: 4 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 152 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 4

```

      5       10       15
      |       |       |
1   Met Asp Asn Val Gln Pro Lys Ile Lys His Arg Pro Phe Cys Phe
16  Ser Val Lys Gly His Val Lys Met Leu Arg Leu Ala Leu Thr Val
31  Thr Ser Met Thr Phe Phe Ile Ile Ala Gln Ala Pro Glu Pro Tyr
46  Ile Val Ile Thr Gly Phe Glu Val Thr Val Ile Leu Phe Phe Ile
61  Leu Leu Tyr Val Leu Arg Leu Asp Arg Leu Met Lys Trp Leu Phe
76  Trp Pro Leu Leu Asp Ile Ile Asn Ser Leu Val Thr Thr Val Phe
91  Met Leu Ile Val Ser Val Leu Ala Leu Ile Pro Glu Thr Thr Thr
106 Leu Thr Val Gly Gly Gly Val Phe Ala Leu Val Thr Ala Val Cys
121 Cys Leu Ala Asp Gly Ala Leu Ile Tyr Arg Lys Leu Leu Phe Asn
136 Pro Ser Gly Pro Tyr Gln Lys Lys Pro Val His Glu Lys Lys Glu
151 Val Leu
  
```

图 2

(1) SEQ ID NO: 5 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 204 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 5

```

      3       9      15      21      27      33      39      45
      |       |      |      |      |      |      |      |
1   ATG GAT AAC GTG CAG CCG AAA ATA AAA CAT CGC CCC TTC TGC TTC
46  AGT GTG AAA GGC CAC GTG AAG ATG CTG CGG CTG GTG TTT GCA CTT
91  GTG ACA GCA GTA TGC TGT CTT GCC GAC GGG GCC CTT ATT TAC CGG
136 AAG CTT CTG TTC AAT CCC AGC GGT CCT TAC CAG AAA AAG CCT GTG
181 CAT GAA AAA AAA GAA GTT TTG TAA
```

(2) SEQ ID NO: 6 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 67 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 6

```

      5              10              15
      |              |              |
1   Met Asp Asn Val Gln Pro Lys Ile Lys His Arg Pro Phe Cys Phe
16  Ser Val Lys Gly His Val Lys Met Leu Arg Leu Val Phe Ala Leu
31  Val Thr Ala Val Cys Cys Leu Ala Asp Gly Ala Leu Ile Tyr Arg
46  Lys Leu Leu Phe Asn Pro Ser Gly Pro Tyr Gln Lys Lys Pro Val
61  His Glu Lys Lys Glu Val Leu
```

图 3

(1)SEQ ID NO: 7 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 363 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 7

```

3)序列描述: SEQ ID NO: 7
      3       9       15      21      27      33      39      45
      |       |       |       |       |       |       |
1  ATG  GAT  AAC  GTG  CAG  CCG  AAA  ATA  AAA  CAT  CGC  CCC  TTC  TGC  TTC
46 AGT  GTG  AAA  GGC  CAC  GTG  AAG  ATG  CTG  CGG  CTG  GCA  CTA  ACT  GTG
91 ACA  TCT  ATG  ACC  TTT  TTT  ATC  ATC  GCA  CAA  GCC  CCT  GAA  CCA  TAT
136 ATT  GTT  ATC  ACT  GGA  TTT  GAA  GTC  ACC  GTT  ATC  TTA  TTT  TTC  ATA
181 CTT  TTA  TAT  GTA  CTC  AGA  CTT  CAT  CGA  TTA  ATG  AAG  TGG  TTA  TTT
226 TGG  OCT  TTG  CTT  GTG  TTT  GCA  CTT  GTG  ACA  GCA  GTA  TGC  TGT  CTT
271 GGT  GAC  GGG  GCC  CTT  ATT  TAC  CGG  AAG  CTT  CTG  TTC  AAT  CCC  AGC
316 CCC  OCT  TAC  CAG  AAA  ANG  CCT  GTG  CAT  GAA  AAA  AAA  GAA  GTT  TTG
361 TAA

```

(2) SEQ ID NO: 8 的信息

(i)序列特征:

- (A) 长度: 120 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 8

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 8

	5	10	15
1	Met Asp Asn Val Gln Pro Lys Ile Lys His Arg Pro Phe Cys Phe		
16	Ser Val Lys Gly His Val Lys Met Leu Arg Leu Ala Leu Thr Val		
31	Thr Ser Met Thr Phe Phe Ile Ile Ala Gln Ala Pro Glu Pro Tyr		
46	Ile Val Ile Thr Gly Phe Glu Val Thr Val Ile Leu Phe Phe Ile		
61	Leu Leu Tyr Val Leu Arg Leu Asp Arg Leu Met Lys Trp Leu Phe		
76	Trp Pro Tyr Leu Val Phe Ala Leu Val Thr Ala Val Cys Cys Leu		
91	Ala Asp Gly Ala Leu Ile Tyr Arg Lys Leu Leu Phe Asn Pro Ser		
106	Gly Pro Tyr Gln Lys Lys Pro Val His Glu Lys Lys Glu Val Leu		

图 4

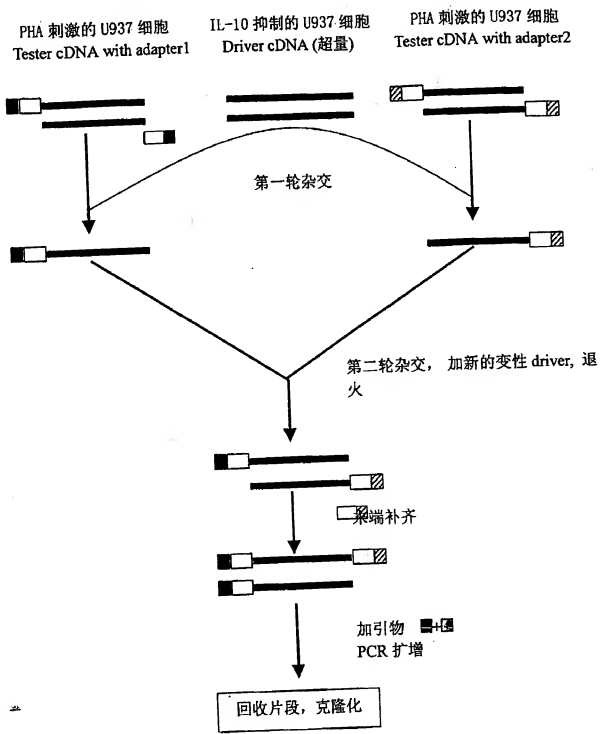


图 5

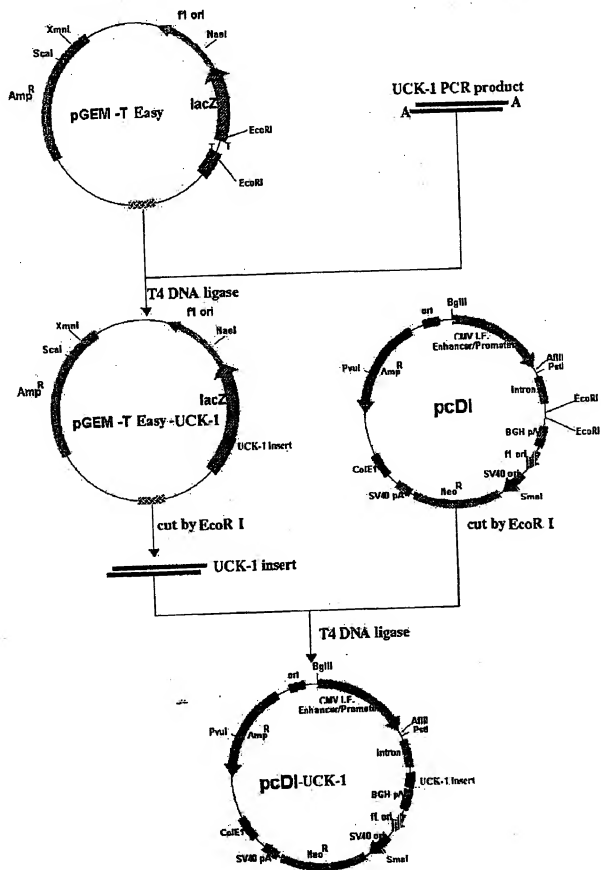


图 6

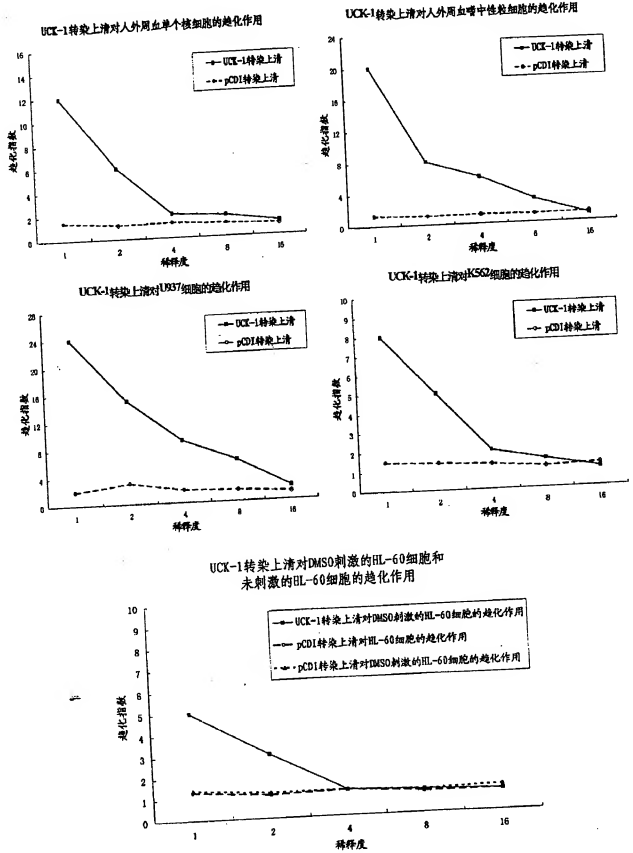


图 7

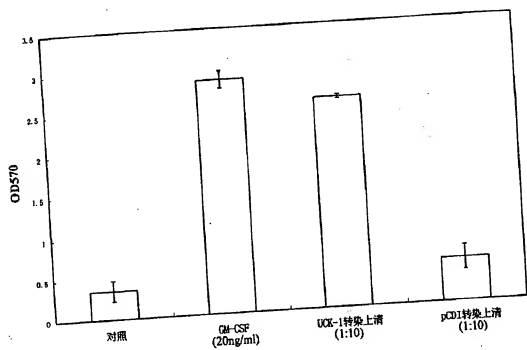


图 8

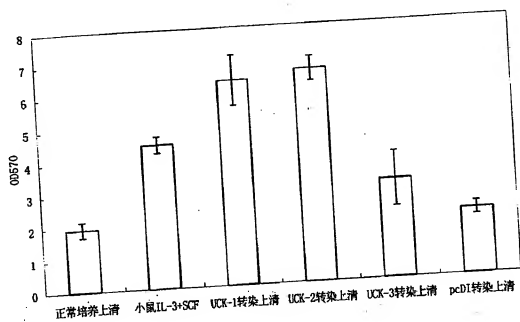
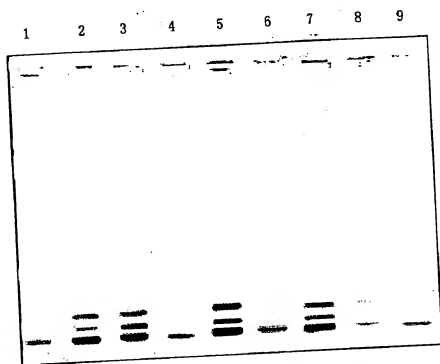


图 9



- | | | |
|--------|------------|------------|
| 1. 结肠 | 2. 结肠腺癌(1) | 3. 结肠腺癌(2) |
| 4. 卵巢 | 5. 卵巢癌 | 6. 胰腺 |
| 7. 胰腺癌 | 8. 脾脏 | 9. 肌肉 |

图 10